

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15594

研究課題名(和文)非侵襲性着床前遺伝子スクリーニングNIPGSをめざす探索研究

研究課題名(英文)Getting genetic information from IVF media for noninvasive prenatal genetic screening

研究代表者

生水 真紀夫 (SHOZU, Makio)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30226302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：体外受精時の培地情報による非侵襲着床前遺伝子スクリーニングの可能性について基礎的な検討を行った。着床早期の母体血中 hCG値が、絨毛のX染色体数を反映していることを確認した。次いで、胚盤胞培地中の hCG値が定量可能であること、また高値および低値とに非着床胚が多くみられることを明らかにした。次に、胚盤胞培地から胚由来ゲノムDNAの検出を試み、微量のDNAを検出した。mRNAは検出できなかったが、miRNA (miR-22) およびミトコンドリアDNA DループのDNAは容易に検出可能であった。以上から、培地情報の診断応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined what kind of genetic information are achievable from blastocyst culture media for possible non-invasive prenatal genetic screening. We found that serum hCG level within one week after implantation was inversely correlated with the number of X-chromosomes. We measured hCG level in used blastocyst culture medium and found that extremely high as well as low levels often resulted in non-implantation or abortion. Trace amount of genomic DNA was detected in the used medium, while mRNA was not. Significant amount of miRNA such as miR-22 as well as mitochondrial DNA (D-loop) were detectable in the blastocyst culture medium. Further study is warranted to determining relationship between these information and genetic constitution of embryo.

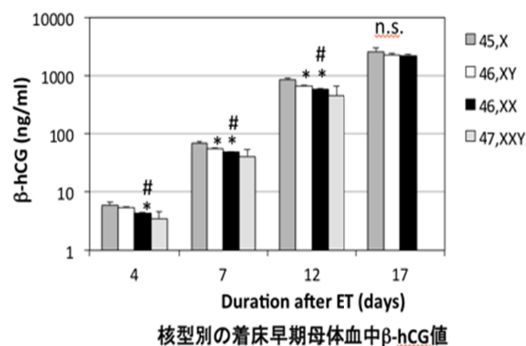
研究分野：生殖内分泌学

キーワード：産婦人科学 産科学 出生前診断 体外受精胚移植 流産

1. 研究開始当初の背景

海外では、着床前遺伝子スクリーニング検査(pre-implantation genetic screening, PGS)が既に臨床応用されており、わが国においても臨床研究が始まっている。現在の PGS は初期胚からの胚生検による方法で実施されており、胚にとって負荷が大きい。実際、PGS 後の妊娠率が期待ほどに高くないことの一つと考えられている。

このような視点から、われわれは非侵襲的な着床前遺伝子スクリーニング検査の可能性を検討した。その結果、体外受精胚移植後の初期母体血中 hCG 値が、胚の性染色体異常とよく相関することを見いだした。hCG 値は、45,X > 46,XY > 46,XX > 47,XXY の順に低下する。この差は、胚移植後 4 日目が最も大きく、その後徐々に小さくなって 17 日目に消失した。この時期は、X 染色体の不活化が進行し、遺伝子量補正が完了するまでの期間であり、hCG の差は遺伝量（性染色体数）に由来している。



*: p<0.001, vs. 45,X, # : p<0.001, vs. 46,XY

2. 研究の目的

予備的検討から、胚の hCG 分泌量は胚の染色体構成を反映している可能性があること、母体血中に比し明瞭な差がある可能性が示された。従って、体外受精培地中の hCG 値を用いて、性染色体核型スクリーニングできる可能性がある。そこで、本研究では、培地中の蛋白および DNA 情報から、胚スクリーニングの可能性について検討することを目的とした。

培地によるスクリーニングは、非侵襲性着床前遺伝子スクリーニング (Non-invasive PGS, NIGPS) とも言える概念であり、現状の PGS の有り様を大きく変えるものである。また本研究は性染色体異常を扱っているが、将来の常染色体異常のスクリーニングに向けた研究への足がかりとなる。

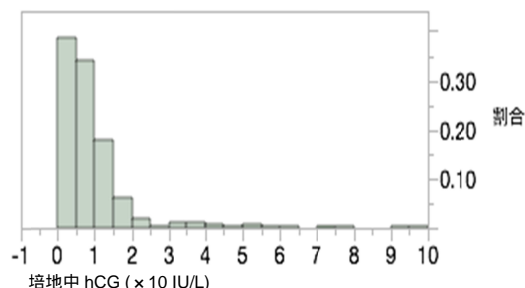
3. 研究の方法

研究への同意を得られた患者の体外受精胚移植時の廃棄培地を回収し、EIA 法により hCG, a-fetoprotein 値を測定した。胚の形態学的発育情報、胚移植後 4 日目、7 日目の母体血中 hCG 値および着床・妊娠に関する臨床情報、流産例では絨毛染色体分析結果を収集し統計学的な検討を行った。また、培地中の cell free RNA, cell free DNA を回収し、逆転写・増幅後にアガロースゲルでの検出、次世代シーケンサーによるシーケンスを実施した。一部の胚については、ミトコンドリア DNA の検出を行い、培地と胚の DNA シーケンスの一致を確認した。

4. 研究成果

(1) 培地中の hCG 濃度

血清 hCG 値測定用 EIA キットを改変して測定系の確立と評価を行った。その結果、培養後の培地中の hCG 値を、10 倍希釈検体を用いて自動測定器 (TOSOH AIA-2000) によ



り再現性良く定量する測定系 (0.1-50 mIU/blastocyst) を確立した。体外受精胚移植に用いられた胚盤胞培地検体を収集し、hCG を測定した。

培地中の hCG 値は、0-11.1 mIU/mL に分布し、中央値 0.69 で高値側広範囲に外れ値が認められた。これらの外れ値を示した検体では妊娠成立率が低く、hCG 異常高値が染色体異常と関連するとの仮説に矛盾しないものであった。主成分分析により、胚盤胞培地 hCG 値情報は、妊娠初期血中 hCG 値や母体年齢とは異なる情報を含むことが示された。また、胚発育速度や栄養外胚葉細胞数とともに固有の胚発生情報を含むことが示された。

-fetoprotein も有用な情報となり得る可能性が示唆されたため、同様に測定を試みたが、培地からの高感度の測定は出来なかった。

(2) 培地中の核酸の検出

mRNA/ゲノム DNA: ヒト体外受精胚の培養済み培地から RNA を抽出し逆転写後に PCR による増幅を行った。21 番染色体特異配列などを含め複数のプライマーセットで検出を行ったところ、増幅シグナルが検出されたが、検討の結果その多くが環境由来 DNA の混入による可能性が否定できなかった。し

たがって、体外受精胚培養に用いられた培地中に胚由来 DNA が存在するがその量は少ないこと、また環境由来 DNA の混入があることが示された。したがって、臨床応用に向けて検出感度の向上とともにコンタミネーションへの対策が必要と考えられた。

miRNA: 次に、培地中 miRNA の検出と診断応用への可能性を検討した。その結果、培地中に胚由来 miR22 が存在していることが示され、miRNA は NIPGS の候補であることを確認した。

mitochondria DNA: 培地中のミトコンドリア DNA D ループ配列に対するプローブを用いて検出が可能であることを確認した。そこで、研究に同意の得られた廃棄胚を培養し、発育のみられた胚培地から DNA を増幅し NGS を行った。その結果、すべての胚でミトコンドリア DNA D ループ可変領域の配列を得ることができた。これを胚のゲノム DNA の NGS 結果と照合したところ、11 検体中 7 例で培地 DNA と胚 DNA が一致、3 例で minor allele drop out が示唆され、1 例については 30% 程度のヘテロプラスミーの存在が疑われる結果となった。これらの結果から、培地によるミトコンドリアヘテロプラスミー診断の可能性があることが示唆された。また、培地中には胚由来のミトコンドリア DNA が存在していることが確認できた。このことは、ミトコンドリア DNA だけでなく胚由来ゲノム DNA が存在している可能性を示すものである。

まとめ : (1) 体外受精時の胚培養培地中には、hCG が分泌されており、対数正規分布を示した。今後、長期間の経過観察によって異常高値、低値と染色体異常との関連を明らかにする必要がある。

(2) 体外受精時の胚培養培地中には、胚由来のミトコンドリア DNA , miRNA(mir22), ゲノム DNA が存在することが確認された。しかし、胚由来 mRNA については存在を確認できなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Qu J, Usui H, Kaku H, Shozu M. Presence of the methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism MTHFR C677T in molar tissue but not maternal blood predicts failure of methotrexate treatment for low-risk gestational trophoblastic neoplasia. *Eur J Pharmacol*.2017 Jan 5;794:85-91.doi:10.1016-j.ejphar.2016.11.010. Epub 2016 Nov 11. 査読あり
2. Koyanagi T, Fujiwara H, Usui H, Ariga H, Machida S, Takei Y, Saga Y, Shozu M, Fukushima N, Niki T, Matsubara S, Suzuki M Ovarian nongestational

choriocarcinoma and associated adenocarcinoma with the same germ cell origin determined by a molecular genetic approach: A case report. *Pathol Int*. 2016 Sep; 66(9):529-34. doi: 10.1111/pin.12445. Epub 2016 Aug 3. 査読あり

3. Kaku H, Usui H, Qu J, Shozu M. Mature cystic teratomas arise from meiotic oocytes, but not from pre-meiotic oogonia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 Apr; 55(4):355-64. doi:10.1002/gcc.22339. Epub 2016 Jan 21. 査読あり

4. Teramoto S, Osada H, Sato Y, Shozu M. Nondominant small follicles are a promising source of mature oocytes in modified natural cycle in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril*. 2016 Jul;106(1):113-8. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.03.015. Epub 2016 Mar 31. 査読あり

5. Ishikawa H, Sanada M, Shozu M. Ovarian pregnancy associated with a fresh blastocyst transfer following in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015 Nov; 41(11):1823-5. doi: 10.1111/jog.12790. Epub 2015 Jul 30. 査読あり

6. Ishikawa H, Kiyokawa T, Okayama J, Usui H, Shozu M. Tubal pregnancy associated with additional conception in a contralateral tube. *Obstet Gynaecol Res*. 2015 Sep; 41(9):1487-90. Doi:10.1111/jog.12744. Epub 2015 Jun 22. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 生水真紀夫 卵胞発育と排卵 - IVF・ET からみえてきた新しい理解 - 第 16 回産婦人科内分泌研究会、名古屋マリオットアソシアホテル(2016.7.16、愛知県名古屋市)
2. 生水真紀夫 卵胞発育と排卵 - 体外受精からみえてきたもの - 第 4 回 FARM(Fukui Art Reproductive Medicine) 研究会、福井商工会議所ビル(2016.5.28、福井県福井市)
3. 大久保毅、石川博士、小林達也、水口麻侑子、松尾涼子、林輝明、恩田知幸、上野剛、瀬川智也、宮内修、生水真紀夫、寺元章吉 小卵胞内における顆粒膜細胞および卵胞液中ホルモン値から解析した卵子成熟過程の考察 第 21 回日本臨床エンブリオロジスト学会学術集会、アパホテル金沢駅西(2016.1.9-10、石川県金沢市)
4. 小林達也、石川博士、石井久美子、金谷裕美、森本沙知、河原井麗正、生水真紀夫 タイムラプス型培養システムを使用した多核割球胚に関する検討 第 1329 回

千葉医学会例会生殖医学（産科婦人科）分科会、千葉市文化センター（2015.12.12、千葉県千葉市）

5. Segawa T, Teramoto S, Miyauchi O, Omi K, Watanabe Y, Kuroda M, Okubo T, Shozu M. Rapid growth and grading system for assisted-hatching blastocysts to predict clinical outcome. 31th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction & Embryology (ESHRE) (2015.6.14-17,Lisbon, Portugal)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

生水 真紀夫 (SHOZU, Makio)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30226302

(2)研究協力者

小林達也 (KOBAYASHI, Tatsuya)
曾根原弘樹 (SONEHARA, Hiroki)
寺元章吉 (TERAMOTO, Syokichi)
瀬川智也 (SEGAWA, Tomoya)
大久保毅 (OOKUBO, Tsuyoshi)